

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

B25

JP1994116300A

1994-4-26

**Bibliographic Fields**

**Document Identity**

(19)【発行国】

日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報(A)

(11)【公開番号】

特開平6-116300

(43)【公開日】

平成6年(1994)4月26日

**Public Availability**

(43)【公開日】

平成6年(1994)4月26日

**Technical**

(54)【発明の名称】

ケラチンフラグメントおよびその製造方法

(51)【国際特許分類第5版】

C07K 15/20 8517-4H

3/10 8517-4H

C12P 21/06 8214-4B

【請求項の数】

6

【全頁数】

7

**Filing**

【審査請求】

未請求

(21)【出願番号】

特願平4-296482

(22)【出願日】

平成4年(1992)10月7日

**Parties**

**Applicants**

(71)【出願人】

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 6 - 116300

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1994 (1994) April 26 days

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1994 (1994) April 26 days

(54) [Title of Invention]

KERATIN FRAGMENT AND ITS MANUFACTURING METHOD

(51) [International Patent Classification, 5th Edition]

C07K 15/20 8517-4H

3/108517 - 4 H

C12P 21/06 821 4- 4B

[Number of Claims]

6

[Number of Pages in Document]

7

[Request for Examination]

Unrequested

(21) [Application Number]

Japan Patent Application Hei 4 - 296482

(22) [Application Date]

1992 (1992) October 7 days

(71) [Applicant]

JP1994116300A

1994-4-26

【識別番号】

000147213

【氏名又は名称】

株式会社成和化成

【住所又は居所】

大阪府東大阪市布市町1丁目2番14号

(71)【出願人】

【識別番号】

592005788

【氏名又は名称】

山内 清

【住所又は居所】

大阪府河内長野市北青葉台27-19

Inventors

(72)【発明者】

【氏名】

山内 清

【住所又は居所】

大阪府河内長野市北青葉台27-19

Agents

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】

三輪 鐵雄

Abstract

(57)【要約】

【目的】

フィルム、繊維などに加工した場合に好適な強度を持ち得るようになる適度な長さのペプチド鎖と架橋可能なチオール基を有し、フィルム、繊維、スポンジなどの材料として、あるいはマイクロカプセルの壁材、医薬薬基材、化粧品基材として、好適に使用できるケラチンフラグメントを提供する。

【構成】

ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまた

[Identification Number]

000147213

[Name]

SEIWA KASEI, K.K. (DB 69-348-6227)

[Address]

Osaka Prefecture Higashi Osaka City Nunoichi-cho 1-2-14

(71) [Applicant]

[Identification Number]

592005788

[Name]

YAMAUCHI IT IS CLEAR

[Address]

Osaka Prefecture Kawachinagano City north Aobadai 27 - 19

(72) [Inventor]

[Name]

Yamauchi it is clear

[Address]

Osaka Prefecture Kawachinagano City north Aobadai 27 - 19

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name]

Miwa Tetsuo

(57) [Abstract]

[Objective]

When it processes in film, fiber etc, it possesses peptide chain and the crosslinkable thiol group of suitable length which reaches point where it can have preferred intensity it offers keratin fragment which can be used for ideal as film, fiber, sponge or other material, or as wall material, pharmaceuticals and pesticides substrate, cosmetics substrate of microcapsule.

[Constitution]

Reducing keratin containing substance, hydrolysis to do reduction keratin which itacquires with protein hydrolase, inactivation doing protein hydrolase in hydrolysis,

は反応系外に分離して、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限して、平均分子量 3,000~30,000 でアミノ酸 100 残基当りシステインを 4~16 個有するケラチンフラグメントを製造する。

#### Claims

##### 【特許請求の範囲】

##### 【請求項 1】

平均分子量 3,000~30,000 で、アミノ酸 100 残基当りシステインを 4~16 個有するケラチンフラグメント。

##### 【請求項 2】

ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離して、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限することを特徴とする請求項 1 記載のケラチンフラグメントの製造方法。

##### 【請求項 3】

蛋白質分解酵素を禁止剤により失活させる請求項 2 記載のケラチンフラグメントの製造方法。

##### 【請求項 4】

蛋白質分解酵素を加熱により失活させる請求項 2 記載のケラチンフラグメントの製造方法。

##### 【請求項 5】

蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素を用い、該固定化蛋白質分解酵素を遠心分離または濾過により反応系外に分離する請求項 2 記載のケラチンフラグメントの製造方法。

##### 【請求項 6】

蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素を用い、該固定化蛋白質分解酵素をカラムに充填し、該カラムに還元ケラチン水溶液を通過させ、通過の間のみ加水分解して、加水分解中に固定化蛋白質分解酵素を反応系外に分離する請求項 2 記載のケラチンフラグメントの製造方法。

#### Specification

##### 【発明の詳細な説明】

【0001】

or separating outside reaction system, stopping hydrolysis, restricting the extent of hydrolysis, per amino acid 100 residue it produces keratin fragment which 4 - 16 possesses cysteine with average molecular weight 3,000~30,000.

##### [Claim(s)]

##### [Claim 1]

With average molecular weight 3,000~30,000, per amino acid 100 residue keratin fragment. which 4 - 16 possesses cysteine

##### [Claim 2]

Reducing keratin containing substance, hydrolysis to do reduction keratin which it acquires with protein hydrolase, inactivation doing protein hydrolase in hydrolysis, or separating outside reaction system, stopping hydrolysis, it restricts the extent of hydrolysis manufacturing method. of keratin fragment which is stated in Claim 1 which is made feature

##### [Claim 3]

protein hydrolase with blocking agent inactivation manufacturing method. of keratin fragment which is stated in Claim 2 which is done

##### [Claim 4]

protein hydrolase with heating inactivation manufacturing method. of keratin fragment which is stated in Claim 2 which is done

##### [Claim 5]

Making use of fixation protein hydrolase which bears protein hydrolase in polymer, separates said fixation protein hydrolase outside reaction system due to centrifugal separation or filtration manufacturing method. of keratin fragment which is stated in Claim 2 which

##### [Claim 6]

said fixation protein hydrolase to be filled in column making use of the fixation protein hydrolase which bears protein hydrolase in polymer, passing the reduction keratin aqueous solution in said column, only during of passing doing hydrolysis, manufacturing method. of keratin fragment which it states in Claim 2 which in hydrolysis separates fixation protein hydrolase outside reaction system

##### [Description of the Invention]

【0001】

## 【産業上の利用分野】

本発明は、平均分子量 3,000~30,000 で、活性なチオール基(SH 基)を有し、たとえばフィルム、スポンジ、マイクロカプセル、繊維、医薬薬基材、化粧品基材などの産業用品の製造に好適に使用されるケラチンフラグメント(ケラチン蛋白断片)およびその製造方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

毛髪、獣毛、羽毛などの動物組織中に構造タンパクとして存在するケラチンは、従来から、フィルム、繊維などの産業素材原料として注目されてきた。

## 【0003】

そして、これらのケラチンは、天然のケラチン含有物質を酸、アルカリまたは酵素などにより加水分解して短分子量化した加水分解物の水溶液として利用するか、あるいは還元剤と尿素などの蛋白質変成剤との共用によりケラチンのジスルフィド結合をチオール基に還元開裂して生成した還元ケラチンの水溶液として利用するか、あるいは上記の還元ケラチンのチオール基の再結合防止のためにモノヨード酢酸や亜硫酸ナトリウム/テトラチオン酸ナトリウムなどにより不可逆的な化学修飾を施したケラチン誘導体の水溶液として利用するか、あるいは還元開裂と蛋白質分解酵素により短分子量化したケラチン加水分解物の水溶液などとして利用されてきた。

## 【0004】

上記のように、ケラチンは天然ケラチンの分子量をほぼ維持したままの状態ではなんらかの加工を経て利用されるか、あるいは化学的または酵素による加水分解処理によって分子量 1,000~2,000 のものを実質的な成分とする短分子量化ケラチン加水分解物としてかなりの水溶性を付与した上で、化粧品基材などに利用されてきた。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来のケラチンやケラチン加水分解物はチオール基がジスルフィド基に酸化されたり不可逆的な化学修飾が施されているため、活性なチオール基に特有な反応性を充分に利用することができなかつたり、あるいは分子量が小さいためにフィルムなどに加工したときに強度

## 【Field of Industrial Application】

this invention, with average molecular weight 3,000~30,000, has active thiol group (SH group), keratin fragment which is used for ideal for production of for example film, sponge, microcapsule, fiber, pharmaceuticals and pesticides substrate, cosmetics substrate or other industry goods (keratin protein fragment) and regards its manufacturing method.

## 【0002】

## 【Prior Art】

keratin which exists as structure protein was observed in hair, animal fur, feather or other animal tissue from until recently, as film, fiber or other industry material starting material.

## 【0003】

And, natural keratin containing substance hydrolysis doing with acid, alkali or enzyme etc it utilizes these keratin, to short molecular weight as aqueous solution of hydrolysate which it converts, or reduction cleavage doing disulfide bond of keratin in thiol group with common use with reductant and urea or other protein modifier, it utilizes as aqueous solution of reduction keratin which it forms?, Or it utilizes for recombination prevention of thiol group of the above-mentioned reduction keratin as aqueous solution of keratin derivative which administers irreversible chemical modification with mono iodo acetic acid and sodium sulfite/tetra thionic acid sodium etc, or it was utilized as reduction cleavage and with protein hydrolase to short molecular weight aqueous solution etc of keratin hydrolysate which is converted.

## 【0004】

As description above, keratin is utilized, or passing by a some processing with state while molecular weight of natural keratin is almost maintained after granting considerable water solubility as short molecular weight conversion keratin hydrolysate which with chemical or enzyme designates those of molecular weight 1,000~2,000 as effective component with hydrolysis, was utilized in cosmetics substrate etc.

## 【0005】

## 【Problems to be Solved by the Invention】

But, because conventional keratin and keratin hydrolysate thiol group oxidation are done in disulfide group and/or irreversible chemical modification is administered, reactivity which is peculiar to active thiol group is utilized in satisfactory not to be possible, when or because molecular weight it is small processing in the film etc, intensity being inferior, at

が劣り、水中ではすぐ崩壊するなどの欠点があった。

【0006】

したがって、本発明は、天然ケラチンよりも低分子量ではあるが、蛋白質分子としての性質(フィルム、繊維などに加工した場合の強靱性)を有する適度な長さのペプチド鎖と架橋反応が可能なチオール基を有するケラチンフラグメントおよびその製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限するときは、平均分子量3,000~30,000(好ましくは平均分子量7,000~30,000)で、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有するケラチンフラグメントが得られることを見出し、本発明を完成するにいたった。

【0008】

上記ケラチンフラグメントは、平均分子量が3,000~30,000と、従来の短分子量化したケラチン加水分解物に比べて分子量が大きく、蛋白質分子としての性質を保持する適度な長さのペプチド鎖を有しているため、フィルム、繊維などに加工した場合に望ましい強度が得られる。

【0009】

また、上記のケラチンフラグメントは、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有しており、そのシステイン残基がチオール基を有しているため、そのチオール基間の架橋反応により高分子化することができる。

【0010】

すなわち、このチオール基を空気酸化により架橋するか、あるいは過酸化水素や過ヨウ素酸ソーダなどの酸化剤により架橋してジスルフィド結合を生成させることによって、架橋剤を使用しなくても高分子化することができ、フィルム、スポンジ、マイクロカプセルなどの基材として十分な強度を持たせることができる。

【0011】

underwater there was a or other deficiency which collapses immediately.

【0006】

Therefore, as for this invention, is low-molecular-weight in comparison with the natural keratin, but as protein molecule keratin fragment and its manufacturing method which possess the thiol group where peptide chain and crosslinking reaction of suitable length which possesses the property (toughness when it processes in film, fiber etc) are possible are offered make objective.

【0007】

【Means to Solve the Problems】

this inventor result of diligent research, reducing keratin containing substance in order to achieve above-mentioned objective, hydrolysis to do reduction keratin which it acquires with protein hydrolase, inactivation doing protein hydrolase in hydrolysis, or stopping hydrolysis it separates outside reaction system with, when restricting extent of hydrolysis, with average molecular weight 3,000~30,000 (preferably average molecular weight 7,000~30,000), Per amino acid 100 residue keratin fragment which 4 - 16 possesses cysteine is acquired to discover, completing this invention it reached point of.

【0008】

As for above-mentioned keratin fragment, molecular weight to be large average molecular weight 3,000 - 30,000 and to conventional short molecular weight in comparison with the keratin hydrolysate which is converted, because it has possessed peptide chain of the suitable length which keeps property as protein molecule, when it processes in the film, fiber etc, desirable intensity is acquired.

【0009】

In addition, above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue 4 - 16 to have had cysteine, because cysteine residue has had thiol group, polymerization it is possible with crosslinking reaction between thiol group.

【0010】

crosslinking doing this thiol group of namely, with air oxidation, or crosslinking doing with hydrogen peroxide and periodic acid soda or other oxidant not using crosslinking agent it forms the disulfide bond with, polymerization it does, it to be possible, it can give satisfactory intensity as film, sponge, microcapsule or other group material, it is possible.

【0011】

上記平均分子量 3,000~30,000 で、アミノ酸 100 残基当りシステインを 4~16 個有するケラチンフラグメントを得るにあたって、ケラチン含有物質から還元ケラチンを得る工程は公知の方法を含め各種の方法を採用することができる。

【0012】

そして、還元ケラチンから制限的に加水分解して平均分子量 3,000~30,000 で、アミノ酸 100 残基当りシステインを 4~16 個有するケラチンフラグメントを得る工程は、本発明者が本発明の完成にあたって特に開発した方法によるので、これについて先に詳しく説明する。

【0013】

すなわち、本発明において、上記平均分子量 3,000~30,000 で、アミノ酸 100 残基当りシステインを 4~16 個有するケラチンフラグメントを得るには、ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する。

【0014】

この還元ケラチンの加水分解にあたって、蛋白質分解酵素としては、ペプチド結合について限られた分解特異性を持つトリプシンやカイモトリプシンが特に好適であるが、これらに限らず、ブロメライン、ジスパーゼ(Dispase)、フィチン、パパイン、ペプシン、サーモライシンなどの蛋白質分子の内部ペプチド結合を非特異的に切断するエンドペプチターゼであつてもよい。

また、固定化トリプシン(Trypsin-30, Beohringer Mannheim, Cat.No.109851)などのように蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素なども用いることができる。

【0015】

還元ケラチンの加水分解そのものは(つまり、加水分解中に加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限することを除いては)、特に限定されることはないが、たとえば、還元ケラチンを水溶液にし(還元ケラチンの濃度にして 1~5 重量%が好ましい)、この還元ケラチンの水溶液を 5~80 deg C、好ましくは 20~50 deg C に保持しながら、蛋白質分解酵素を加え、攪拌することによって行われる。

【0016】

還元ケラチンを蛋白質分解酵素で制限することなく加水分解していくと、得られる加水分解物は

When with above-mentioned average molecular weight 3,000~30,000, per amino acid 100 residue keratin fragment which 4 - 16 possesses cysteine is obtained, step which obtains reduction keratin from keratin containing substance includes known method and can adopt various method.

【0012】

And, from reduction keratin hydrolysis doing in restricted, because with average molecular weight 3,000~30,000, per amino acid 100 residue step which obtains keratin fragment which 4 - 16 possesses cysteine, this inventor with method which especially it developed at time of completion of this invention, you explain first in detail concerning this.

【0013】

Regarding to namely, this invention, with above-mentioned average molecular weight 3,000~30,000, per amino acid 100 residue to obtain keratin fragment which 4 - 16 possesses cysteine, reducing keratin containing substance, hydrolysis to do reduction keratin which it acquires with protein hydrolase, inactivation doing protein hydrolase in hydrolysis, or stopping hydrolysis it separates outside reaction system with, it restricts extent of hydrolysis.

【0014】

At time of hydrolysis of this reduction keratin, as protein hydrolase, is limited concerning peptide bond trypsin which has disassembly specificity which (EC 3.4.21.4) and mosquito potato trypsin (EC 3.4.21.4) especially is ideal, but bromelain, di s per ze (Dispase), it is good even with endo ペプ jp8 tar ぜ which cuts off internal peptide bond of phytic acid, papain, pepsin, thermo Lai syn or other protein molecule in nonspecific not just these.

In addition, immobilized trypsin (Trypsi n- 30, Beohr inger Mannheim, Ca t.No.109851) or other way you can use also fixation protein hydrolase etc which bears protein hydrolase in polymer.

【0015】

As for hydrolysis itself of reduction keratin (In other words, stopping hydrolysis in hydrolysis, it restricts the extent of hydrolysis excluding), there are not times when especially it is limited. While designating for example reduction keratin as aqueous solution and (1 - 5 weight% are desirable to concentration of reduction keratin.), keeping aqueous solution of this reduction keratin in 5 - 80 deg C, preferably 20~50 deg C, it is done including protein hydrolase, it agitates by.

【0016】

When hydrolysis it does without restricting reduction keratin with protein hydrolase, because hydrolysate which is acquired

分子量がどんどん低下していくので、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する。

[0017]

その際の蛋白質分解酵素の失活にあたっては、蛋白質分解酵素の禁止剤を使用するか、加熱するかのいずれかが採用される。

[0018]

上記蛋白質分解酵素の禁止剤としては、それぞれの蛋白質分解酵素に適した禁止剤があり、トリプシン、カイモトリプシンなどや上記のエンドペプチターゼには、たとえばアンチトリプシン、トリプシニンヒビター、アプロチニン、リュベプチン (Leupeptin)、マクログロブリンなどが用いられる。

[0019]

また、加熱により蛋白質分解酵素を失活させる場合は、たとえば、加水分解中の反応液を急速に加熱して沸騰させればよい。

[0020]

一方、蛋白質分解酵素を反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する方法を採用する場合には、固定化蛋白質分解酵素を使用するのが好ましい。

[0021]

すなわち、還元ケラチンの水溶液に固定化蛋白質分解酵素を加え、加水分解し、その加水分解中に遠心分離または濾過により、その固定化蛋白質分解酵素を反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限して、平均分子量 3,000~30,000 のケラチンフラグメントを得ることができる。

[0022]

また、加水分解中に蛋白質分解酵素を分離する方法を採用する場合には、上記のように還元ケラチンの水溶液に固定化蛋白質分解酵素を加える方法とは異なり、固定化蛋白質分解酵素そのもの、または固定化蛋白質分解酵素を分子ふるいの役目を果たすゲル(たとえば、Sephadex G-100)と共にカラムに充填し、そのカラムに還元ケラチンの水溶液を通過させ、その通過の間のみ加水分解させ、還元ケラチンの加水分解中に蛋白質分解酵素を反応系外に分離させる方法も採用することができる。

[0023]

decreases molecular weight steadily, inactivation doing protein hydrolase in hydrolysis, or stopping the hydrolysis it separates outside reaction system with, it restricts the extent of hydrolysis. TRANSLATION STALLED

[0017]

At that case heat of any whether you use blocking agent of protein hydrolase at time of inactivation of protein hydrolase, is adopted.

[0018]

As blocking agent of above-mentioned protein hydrolase, there is a blocking agent which issuited for respective protein hydrolase, trypsin (EC 3.4.21.4), mosquito potato trypsin (EC 3.4.21.4) etc and for example antitrypsin, tri プシニン crack tar, aprotinin, rue ペプ tin (Leupeptin), can useto above-mentioned endo ペプ jp8 tar ぜ, macroglobulin etc.

[0019]

In addition, when inactivation it does protein hydrolase with heating, heating reaction mixture in for example hydrolysis quickly, boiling it should have done.

[0020]

On one hand, stopping hydrolysis protein hydrolase is separated outside the reaction system with, when it takes method which restricts extent of hydrolysis, it is desirable to use fixation protein hydrolase.

[0021]

hydrolysis it makes aqueous solution of namely, reduction keratin including fixation protein hydrolase, stopping hydrolysis due to centrifugal separation or filtration, fixation protein hydrolase is separated outside reaction system with, it can restrict extent of hydrolysis in hydrolysis, can acquire keratin fragment of average molecular weight 3,000~30,000.

[0022]

In addition, when method which separates protein hydrolase in hydrolysis is adopted, as description above unlike method which adds fixation protein hydrolase to aqueous solution of reduction keratin, fixation protein hydrolase itself. Or fixation protein hydrolase with gel (for example Sephadex G-100) which carries out role of molecule sieve to be filled in column, passing aqueous solution of the reduction keratin in column, only during of passing doing the hydrolysis, you can adopt also method which in hydrolysis of the reduction keratin separates protein hydrolase outside reaction system.

[0023]



なお、市販品の蛋白質分解酵素や固定化蛋白質分解酵素の活性は、バッチごとに変動し一定品質のものが入手しにくいので、加水分解処理液を SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)ポリアクリルアミド電気泳動法で分析し、ケラチン原料(分子量 40,000~60,000 が主)の泳動パターンから分子量 40,000~60,000 の主蛋白バンドが消失し、加水分解物の主バンドの分子量がほぼ 10,000~30,000 と認められる時点を目安とし、最適な最終酵素処理ユニット量と処理時間、固定化蛋白質分解酵素量および該固定化蛋白質分解酵素と還元ケラチン水溶液との接触時間あるいは滞留時間を決定することが望ましいが、酵素使用量は、通常、還元ケラチン 20mg/ml 当り 100~3,000 ユニットの範囲から選ばれ、処理時間は、通常、3~30 分の範囲から選ばれる。

## [0024]

つぎに、上記の制限加水分解工程で使用する還元ケラチンを得るまでの還元工程について詳しく説明する。

## [0025]

ケラチン含有物質を還元して還元ケラチンを得る方法としては、公知の方法を含め各種の方法を採用できる。

それらのうち、代表的なものを例示すると、たとえば次の 1~2 に示すものが挙げられる。

## [0026]

1 ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元し、不溶物を遠心分離または濾過により除去した後、得られた水溶液に塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加して塩析させ、抽出された還元ケラチンを沈殿させて、還元ケラチンを単離する。

## [0027]

2 ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元し、抽出された還元ケラチンを透析によって単離する。

## [0028]

上記 1、2 の方法とも、還元時に超音波を照射して、還元抽出を促進させることができる。

## [0029]

Furthermore, protein hydrolase of commercial product and activity of fixation protein hydrolase to fluctuate in every batch, because those of constant quality are difficult to procure, hydrolysis liquid is analyzed with SDS (sodium dodecyl sulfate) polyacrylamide electrophoresis method, time point where main protein band of molecular weight 40,000~60,000 disappears from phoresis pattern of keratin starting material (molecular weight 40,000~60,000 is main), molecular weight of main band of hydrolysate almost 10,000~30,000 and is recognized is designated as criterion, Decides contact time or residence time of optimum final enzyme treatment unit quantity and the process time, fixation protein hydrolase quantity and said fixation protein hydrolase and the reduction keratin aqueous solution is desirable, but enzyme amount used, of usually, per reduction keratin 20 mg/ml is chosen from range 100 - 3,000 unit, process time, of usually, is chosen from range 3 - 30 min.

## [0024]

Until next, reduction keratin which is used with above-mentioned restriction hydrolysis process is obtained, you explain in detail concerning reduction step.

## [0025]

Reducing keratin containing substance, it includes known method as method which obtains reduction keratin, can adopt various method.

When among those, representative ones are illustrated, you can list those which for example following are shown in 1 - 2.

## [0026]

In aqueous medium, under, or protein modifier and detergent existing of protein modifier under existing, it reduces 1 keratin containing substance with reductant, after removing insoluble matter with centrifugal separation or filtration, adding sodium chloride and ammonium sulfate or other inorganic salt in aqueous solution which is acquired, salt precipitation doing, precipitating reduction keratin which is extracted, it isolates the reduction keratin.

## [0027]

2 keratin containing substance in aqueous medium, under existing of protein modifier and the detergent, are reduced with reductant, reduction keratin which is extracted is isolated with dialysis.

## [0028]

Description above also method of 1 and 2, irradiating ultrasound when reducing, reduction extraction can be promoted.

## [0029]

上記 1、2 の方法とも、本発明者が開発したものであるが、特に 1 の方法による場合、短時間でかつ収率よく還元ケラチンを単離することができ、本発明の実施にあたって好適に適用できるので、それについて詳しく説明する。

【0030】

上記 1 の方法では、還元ケラチンを製造するにあたっては、まずケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元する。

【0031】

上記の還元工程で出発原料として用いるケラチン含有物質としては、ケラチンを含むものであればよく、たとえば人間の毛髪、羊毛、馬毛、牛毛などの獣毛や、鶏などの鳥類の羽毛、牛などの動物の爪や角、ひずめ(蹄)、うろこ(鱗)などを用いることができる。

【0032】

上記の水性媒体は、水単独、または水と水混和性の有機溶媒との混合物であってもよく、含水率が 50 重量%以上、好ましくは 80 重量%以上の溶媒を用いる。

水混和性の有機溶媒としては、たとえばメタノール、エタノールなどの低級脂肪族アルコールなどが挙げられる。

【0033】

還元剤は、ケラチン含有物質中のケラチンのジスルフィド結合を還元してチオール基に変換する作用をするものであり、この還元剤としては、たとえば 2-メルカプトエタノール、チオグリコール酸、ジチオスレイトール、ジチオエリトリールなどのチオール化合物;トリプロピルホスフィン、トリブチルホスフィンなどの有機リン化合物;亜硫酸水素ナトリウムなどの還元能力を持つ無機化合物などが用いられる。

【0034】

これらの還元剤の使用量は、ケラチン含有物質 10g に対して 0.05-0.50 モルであり、還元反応の効率と経済性を考慮すると、ケラチン含有物質 10g に対して 0.05-0.20 モルが好ましい。

【0035】

蛋白質変成剤は、ケラチン中の水素結合を切

Description above it is something where this inventor developed also the method of 1 and 2,, but with method of especially 1 when, and the yield reduction keratin is isolated well with short time to be possible, because it can apply to ideal at time of the execution of this invention, you explain in detail concerning that.

【0030】

With method description above 1, when reduction keratin is produced, first keratin containing substance in aqueous medium, under, or protein modifier and the detergent existing of protein modifier under existing, is reduced with reductant.

【0031】

With above-mentioned reduction step if something which includes keratin as starting material as keratin containing substance which it uses, it should have been, the hair, wool, horse wool, cattle wool or other animal fur of for example person and fingernail and angle of feather, cattle or other animal of chicken or other birds, be warped (Hoof), cavity can use (scale) etc.

【0032】

Above-mentioned aqueous medium is good even with mixture of water alone, or water and organic solvent of water miscibility, moisture content uses the solvent of 50 weight % or more, preferably 80 weight % or more.

As organic solvent of water miscibility, you can list for example methanol, ethanol or other lower fatty alcohol etc.

【0033】

As for reductant, reducing disulfide bond of keratin in keratin containing substance, being something which does action which it converts to thiol group, it can use inorganic compound etc which has for example 2-mercaptoethanol, thioglycolic acid, dithiothreitol, dithio erythritol or other thiol compound; tripropyl phosphine, tributyl phosphine or other organophosphorus compound; sodium hydrogen sulfite or other reducing capability as this reductant.

【0034】

As for amount used of these reductant, when with 0.05 - 0.50 mole, efficiency and economy of reduction reaction are considered vis-a-vis the keratin containing substance 10g, 0.05 - 0.20 mole are desirable vis-a-vis keratin containing substance 10g.

【0035】

protein modifier is listed being something which possesses

断する作用を有するもので、その具体例としては、たとえば尿素、チオ尿素などが好適なものとして挙げられる。

そして、爪、ひずめ、うろこなどのように堅い組織のケラチン含有物質を使用する場合には、蛋白質に対して溶解作用を有する水酸化ナトリウム、アンモニアなどを溶解助剤として用いることが好ましい。

[0036]

これらの蛋白質変成剤の濃度と使用量は、ケラチン含有物質の溶解性などを考慮して決定するのが適しているが、通常、ケラチン含有物質に対して3-10mol/l濃度のものを5-40倍重量、好ましくは5-8mol/l濃度のものを10-30倍重量である。

[0037]

還元工程は、上記のような蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で行われるが、後者のように界面活性剤を共存させた場合は、還元速度が速くなり、ケラチン含有物質からの還元ケラチンの抽出速度が向上する。

ただし、界面活性剤は還元ケラチンを可溶化する作用があるので、塩析のために添加する無機塩を多くする必要がある。

[0038]

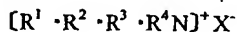
上記界面活性剤としては、下記のアニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも用いることができる。

[0039]

アニオン界面活性剤としては、たとえばドデシル硫酸ナトリウムなどのアルキル硫酸塩、アルキル硫酸エステル塩、脂肪酸アルコールリン酸エステル塩、スルホコハク酸エステル塩などのアニオン界面活性剤などが挙げられる。

[0040]

カチオン界面活性剤としては、たとえば次式で示されるカチオン界面活性剤などが挙げられる。



{式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  の1個または2個は直鎖もしくは分岐鎖を有する炭素数8-20のアルキル基またはヒドロキシアルキル基であり、残余は水素原子、炭素数1-3のアルキル基もしくはヒドロキシアルキル基またはベンジル基

action which cuts off hydrogen bond in keratin, for example urea, thiourea etc making preferred ones, as embodiment.

And, fingernail, be warped, cavity or other way, when the keratin containing substance of hard organization is used, it uses sodium hydroxide, ammonia etc which possesses dissolving action vis-a-vis protein as dissolving aid it is desirable.

[0036]

As for concentration and amount used of these protein modifier, considering solubility etc of keratin containing substance, deciding is suitable, but those of 3 - 10 mol/l concentration 5 - 40 times weight, those of preferably 5-8 mol/l concentration it is 10 - 30 times weight usually, vis-a-vis keratin containing substance.

[0037]

reduction step, as description above is done under existing under, or the protein modifier and detergent existing of protein modifier, but like the latter when the detergent it coexists, reduction rate becomes quick, extraction rate of reduction keratin from keratin containing substance improves.

However, because detergent is action which reduction keratin the solubilizing is done, it is necessary to make inorganic salt which is added because of salt precipitation many.

[0038]

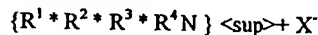
As above-mentioned detergent, in each case of below-mentioned anionic surfactant, cationic surfactant, amphoteric surfactant, nonionic surfactant you can use.

[0039]

As anionic surfactant, you can list for example sodium dodecyl sulfate or other alkyl sulfonate, alkyl sulfuric acid ester salt, aliphatic acid alcohol phosphoric acid ester salt, sulfosuccinic acid ester salt or other anionic surfactant etc.

[0040]

As cationic surfactant, you can list cationic surfactant etc which is shown with the for example next formula.



{In Formula, as for 1 or 2 of  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  and  $R^4$  with alkyl group or hydroxyalkyl group of carbon number 8-20 which possesses straight chain or branched chain, remainder is the alkyl group or hydroxyalkyl group or benzyl group of hydrogen atom, carbon number 1-3. X being a alkyl sulfuric

である。X はハロゲン原子、炭素数 1~2 個のアルキル硫酸基またはアルキルピリジニウムハラドなどの芳香族四級アミン塩などである。]

【0041】

両性界面活性剤としては、たとえば脂肪族アミンの N-カルボキシメチル体、N-スルホアルキル化体、イミダゾリンスルホン酸などのベタイン系の両性界面活性剤(疎水基は主として炭素数 12~14 のアルキル基またはアシル基、対イオンはアルカリ金属などである)などが挙げられる。

【0042】

ノニオン界面活性剤としては、たとえばポリオキシエチレンアルキルエーテル型、脂肪酸エステル型、ポリエチレンイミン型、ポリグリセリンエーテル型、ポリグリセリンエステル型などのノニオン界面活性剤(疎水基は主として炭素数 12~14 のアルキル基もしくはアシル基である)などが挙げられる。

【0043】

そして、この界面活性剤の還元工程での使用量はケラチン含有物質の 5~50 重量%が好ましい。

【0044】

界面活性剤としては、前記したように、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも使用することができるが、なかでもアニオン界面活性剤、たとえばアルキル硫酸塩やポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩などが特に好ましい。

【0045】

この還元工程の具体的操作は、たとえば次のようにして行われる。

すなわち、ケラチン含有物質をその全量が浸るに充分な 5~40 重量倍の 3~10M(mol/l)の蛋白質変成剤の水溶液、たとえば尿素の場合には、5~8M の尿素水溶液に浸漬し、還元剤または還元剤と界面活性剤を加えてから容器を密栓し、室温~100 deg C で 1~24 時間加熱攪拌する。

【0046】

上記還元工程において、反応系に超音波を照射すると、還元抽出作用を促進することができ、還元工程に要する時間を短縮することができる。

超音波照射はプローブ型、浴槽型などの公知の超音波照射装置を用いることができる。

acid group or a alkyl pyridinium halide or other aromatic quaternary amine salt etc of halogen atom, carbon number 1~2, it is }.

【0041】

As amphoteric surfactant, you can list N- carboxymethyl body of for example aliphatic amine and amphoteric surfactant (As for hydrophobic group alkyl group or acyl group, counterion of carbon number 12~14 is alkali metal etcmainly. ) etc of N-sulfo alkylated compound, imidazoline sulfonic acid or other betaine-based.

【0042】

As nonionic surfactant, you can list for example polyoxyethylene alkyl ether type, fatty acid ester type, polyethylene imine type and the polyglycerine ether type, polyglycerine ester type or other nonionic surfactant (hydrophobic group is alkyl group or acyl group of carbon number 12~14 mainly. ) etc.

【0043】

And, amount used with reduction step of this detergent 5 - 50 weight% of keratin containing substance is desirable.

【0044】

As detergent, as before inscribed, in each case of anionic surfactant, cationic surfactant, amphoteric surfactant, nonionic surfactant you can use, but anionic surfactant, for example alkyl sulfonate and polyoxyethylene alkyl ether sulfate etc especially are desirable even among them.

【0045】

Concrete operation of this reduction step is done for example following way.

When total amount it soaks it is a aqueous solution, for example urea of protein modifier of 3 - 10 M (mol/l) of satisfactory 5~40 weight multiple, to soak namely, keratin containing substance in urea aqueous solution of 5 - 8 M, including reductant or reductant and detergent after plugging it does the container, 1 - 24 hours heating and stirring does with room temperature~100 deg C.

【0046】

In above-mentioned reduction step, when ultrasound is irradiated to the reaction system, time when it promotes reduction extraction action it to be possible, requires in reduction step can be shortened.

ultrasound irradiation probe type, can use ultrasound irradiation device of bath type or other public knowledge.

超音波照射の強さは反応系の大きさにより異なるが、たとえば反応系の大きさが 1 リットル以下のときは出力 50-200W で充分である。

[0047]

上記の還元工程を経て得られた反応液は、不溶物を含むので、これを遠心分離や濾過により除去した後、塩析により還元ケラチンを沈殿させる。

[0048]

塩析は、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの無機塩を上記不溶物除去後の水溶液に加えることによって行われる。

この塩析にあたっては、上記水溶液を塩酸などの酸を加えて弱酸性(pH3~5、特に 3.5 付近が好適)にしておくことが好ましい。

また、アセトンやメタノール、エタノールなどの極性有機溶媒を併用添加し、塩析効果を上げてよい。

[0049]

この塩析にあたっての無機塩の添加量はケラチン素抽出液(キューティクルなどの不溶物を除去したもの)に対して無機塩が 0.1-2M の濃度になるようにすることが適しており、特に 0.5-0.7M の濃度になるようにすることが好ましい。

[0050]

塩析時の温度は 0 deg C 付近から 40 deg C の範囲であり、塩析に要する時間は短時間で、長くても 10 分間程度をみておけば充分である。

[0051]

上記のようにして固形物として得られた還元ケラチンは、水洗後、水を加えて水溶液にすることができる。

[0052]

上記の還元工程で生じる現象およびこの 1 の方法が還元ケラチンを得るにあたって優れたものである理由を述べると、次の通りである。

[0053]

まず、ケラチン含有物質を水性媒体中で還元すると、ケラチンは還元されて水性媒体中に溶解

Strength of ultrasound irradiation differs depending upon size of reaction system, but when size of for example reaction system is 1 liters or less, it is a satisfactory with the output 50 - 200 W.

[0047]

Passing by above-mentioned reduction step, because reaction mixture which it acquires includes insoluble matter, it precipitates reduction keratin after removing this with centrifugal separation and filtration, due to salt precipitation.

[0048]

salt precipitation adds sodium chloride, ammonium sulfate, sodium sulfate or other inorganic salt to aqueous solution after description above insoluble matter removing, it is done by.

At time of this salt precipitation, above-mentioned aqueous solution is designated as weak acidity (pH 3~5, especially 3.5 vicinity are ideal) including hydrochloric acid or other acid, it is desirable.

In addition, combined addition it does acetone and methanol, ethanol or other polar organic solvent, is possible to increase salting out effect.

[0049]

inorganic salt tries addition quantity of inorganic salt at time of this salt precipitation that becomes concentration of 0.1 - 2 M vis-a-vis keratin element extracted liquid (Those which remove cuticle or other insoluble matter.) we are suitable, to become concentration of especially 0.5- 0.7 M try, it is desirable.

[0050]

If as for temperature at time of salt precipitation in range of 40 deg C, the time when it requires in salt precipitation with short time, being long, you look at 10 min extent from 0 deg C neighborhoods, it is a satisfactory.

[0051]

As description above it can designate reduction keratin which it acquires as solid, as aqueous solution after water wash, including the water.

[0052]

When method of phenomena and this 1 it occurs with the above-mentioned reduction step obtains reduction keratin when reason which is something which is superior is expressed, as follows is.

[0053]

First, when keratin containing substance is reduced in aqueous medium, being reduced, it melts keratin in aqueous

し、ケラチンを包んでいたキューティクルなどは不溶物として水性媒体中に存在する。

[0054]

そこで、この不溶物を遠心分離または濾過により除去した後、塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加すると塩析が生じ、水性媒体中に溶解していた還元ケラチンが還元された状態を保持したまま、つまりケラチンを還元したときに生成したチオール基がほぼ保持された状態で、溶液中から高収率で沈殿する。

[0055]

一方、還元剤、蛋白質変成剤、界面活性剤などは、水性媒体中に溶解して水性媒体中に残るので、濾過または遠心分離することにより還元ケラチンを反応液から単離することができる。

[0056]

この際、還元ケラチンは、水性媒体中から短時間で沈殿するので、長時間を要する透析や限外濾過による場合のように還元ケラチンが酸化を受けることが少なく、したがってチオール基がほとんど損なわれることなく保持される。

[0057]

上記のような還元工程とそれに続く制限加水分解工程を経て得られたケラチンフラグメントの水溶液は、そのままの状態で利用することができるし、凍結乾燥して粉末として利用に供することができる。

また、限外濾過により濃縮液として利用することも可能である。

[0058]

そして、得られるケラチンフラグメントは、前記のような制限加水分解によって平均分子量 3,000~30,000 のものとすることができる。

[0059]

また、アミノ酸分析によれば、得られるケラチンフラグメント中のシステインは原料のケラチン含有物質中に含まれているケラチンを還元したときに生成したシステインとほぼ同様の割合で存在し、アミノ酸 100 残基当り 4~16 個のシステインを有している。

[0060]

また、上記 2 の方法によって還元工程を実施する場合も、前記 1 の方法と共通する部分は 1 の方法と同様に行うことができる。

medium, it exists in aqueous medium as for cuticle etc which wrapped keratin as insoluble matter.

[0054]

Then, after removing this insoluble matter with centrifugal separation or filtration, when the sodium chloride and ammonium sulfate or other inorganic salt are added, when while state where the reduction keratin which salt precipitation occurs, is dissolving in aqueous medium is reduced is kept, in other words reducing keratin, with state where thiol group which is formed is almost kept, From in solution it precipitates with high yield.

[0055]

On one hand, because reductant, protein modifier, detergent etc, melting in aqueous medium, remains in aqueous medium, it can isolate reduction keratin from reaction mixture by the filtration or centrifugal separation doing.

[0056]

In this case, because from in aqueous medium it precipitates reduction keratin, with short time, with dialysis and ultrafiltration which require the lengthy like when reduction keratin receives oxidation, it is small, it is kept without therefore thiol group being for most part impaired.

[0057]

As description above passing by restriction hydrolysis process which follows that with reduction step, with that way state can utilize and, lyophilizing doing, offering/accompanying is possible aqueous solution of the keratin fragment which it acquires, to utilization as powder.

In addition, with ultrafiltration as concentrated liquid also it is possible to utilize.

[0058]

And, aforementioned way it can designate keratin fragment which is acquired, as those of average molecular weight 3,000~30,000 with restriction hydrolysis.

[0059]

In addition, according to amino acid analysis, cysteine in keratin fragment which is acquired when reducing keratin which is included in keratin containing substance of the starting material, exists at ratio which is almost similar to cysteine which is formed per amino acid 100 residue has possessed cysteine 4 - 16.

[0060]

In addition, when reduction step is executed with method description above 2, it does portion which is in common with method description above 1 in same way as method of 1 it is possible.

## 【0061】

そして、2 の方法における透析処理は従来公知の処理手段によって行うことができる。

たとえば、還元後に不溶物を除いた反応液、すなわち、還元ケラチンを含む濾過液をたとえばセロハンのような半透膜の容器内に入れ、これを外液を入れた容器内に浸す。

外液としては、ジスルフィド結合をチオール基に還元することができる還元剤を 0.1-0.5 重量%含む水性媒体を用いることができ、たとえば上記還元工程で用いた水性媒体と還元剤の混合物を用いることができる。

外液は還元ケラチンの濾過液に対し通常 20-40 容量倍用いられる。

温度は室温でよく、時間は通常 12-36 時間である。

このような透析処理を 2-4 回行うことにより上記濾過液中の蛋白質変成剤、界面活性剤などを除くことができると共に、還元剤を外液と等濃度に減らすことができる。

## 【0062】

還元ケラチンを入手して制限加水分解することも可能であるが、そのような還元ケラチンもケラチン含有物質を還元して得られたものであるから、その場合も、もちろん、本発明の範囲内に含まれる。

## 【0063】

## 【実施例】

つぎに、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はそれらの実施例のみに限定されるものではない。

## 【0064】

## 実施例 1

羊毛(Collidale 種より採取)20g を 5M 尿素水溶液 550g に浸漬し、2-メルカプトエタノール 25ml を添加した後、容器を密栓、撹拌し、約 50 deg C で 5 時間、200W の出力にて超音波照射した。

反応液を室温に戻し、不溶物を濾過により除去した後、濾液を塩酸で pH5 に調整し、その後、硫酸ナトリウムを添加して塩析し、密栓、撹拌した後、遠心分離した。

possible.

## 【0061】

And, it does dialysis in method of 2 with processing means of prior public knowledge it is possible .

After for example reducing you insert filtrate which includes reaction mixture, namely, reduction keratin which excludes insoluble matter into container of semipermeable membrane like for example cellophane, this you dampen inside container which inserted the outside liquid.

As outside liquid, reductant which can reduce disulfide bond in the thiol group 0.1 - 0.5 weight% be able to use aqueous medium which is included, the mixture of aqueous medium and reductant which are used with for example above-mentioned reduction step can be used.

Outside liquid usually 20 - 40 volume times is used vis-a-vis the filtrate of reduction keratin.

temperature may be room temperature, time is usually 12 - 36 hours.

protein modifier, detergent etc in above-mentioned filtrate is excluded this kind of dialysis 2 - 4 times by doing as it is possible, reductant the outside liquid etc is decreased in concentration, it is possible .

## 【0062】

Procuring reduction keratin, restriction hydrolysis also it is possible to do, but that kind of reduction keratin and reducing the keratin containing substance, because it is something which it acquires, in that case, of course, it is included inside range of this invention.

## 【0063】

## 【Working Example(s)】

Next, listing Working Example, furthermore you explain this invention in detail, but this invention is not something where are limited in only those Working Example.

## 【0064】

## Working Example 1

wool (From Collidale kind recovery) it soaked 20 g in 5 Murea aqueous solution 550g, after adding 2 -mercaptoethanol 25 ml, the plugging, it agitated container, with approximately 50 deg C ultrasound irradiation did with output of 5 hours, 200W.

reaction mixture was reset to room temperature, after removing insoluble matter with filtration, filtrate was adjusted pH 5 with hydrochloric acid, after that, it added sodium sulfate and salt precipitation did, plugging, after

## 【0065】

得られた白色沈殿物を 2-メルカプトエタノールを 0.3 重量%含む水で水洗し、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)3g と 2-メルカプトエタノール 0.6g を含む水を加え、アンモニアで pH8~9 に調整しつつ、溶解した。

## 【0066】

この水溶液 10g を Lowry 法により蛋白定量したところ、0.35g の還元ケラチンを含んでおり、この水溶液中の還元ケラチン濃度は 3.5 重量%であって、収率は 35%であった。

また上記水溶液を凍結乾燥して得た還元ケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸 100 残基当リシステインが 8.4 個であった。

## 【0067】

また、上記還元ケラチン粉末の分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、分子量 40,000 から 60,000 のものが主たる成分であった。

## 【0068】

上記のようにして得られた濃度 3.5 重量%の還元ケラチン水溶液 10ml を 20 deg C に保ちながら、その中にトリプシン 2,000 ユニットを含む 0.05M のトリス/塩酸緩衝液(pH8)5ml と 0.01M の塩化カルシウム水溶液 5ml を加え、窒素ガス雰囲気下で 5 分間撹拌した。

## 【0069】

つぎに、1.5mg ユニットのアンチトリプシン (antitrypsin、シグマ社製、商品番号 A9024)水溶液を添加してトリプシンを失活させ、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

## 【0070】

得られた加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量 8,000~24,000 のものを主成分とする混合物であり、その数平均での平均分子量は 17,000 であった。

## 【0071】

上記加水分解液について Lowry 法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は 3.5 重量%であった。

agitating, centrifugal separation it did.

## 【0065】

While white precipitate which it acquires water wash doing with water which 2-mercaptoethanol 0.3 wt% is included, adjusting pH 8~9 with ammonia the sodium dodecyl sulfate (SDS) 3 g and including water which 2-mercaptoethanol 0.6g is included, it melted.

## 【0066】

This aqueous solution 10g with Lowry method when protein quantification it does, we included the reduction keratin of 0.35 g, as for reduction keratin concentration in this aqueous solution with 3.5 weight%, as for yield it was 35%.

In addition lyophilizing doing above-mentioned aqueous solution, when it did the amino acid analysis of reduction keratin powder which it acquires, per amino acid 100 residue cysteine was 8.4.

## 【0067】

In addition, when molecular weight of above-mentioned reduction keratin powder was inspected with SDS Polyacrylamide electrophoresis method, those of molecular weight 40,000 to 60,000 were main component.

## 【0068】

While maintaining reduction keratin aqueous solution 10 ml of concentration 3.5 weight% which it acquires as description above at 20 deg C, 5 min it agitated under nitrogen gas atmosphere in that trypsin (EC 3.4.21.4) tris/hydrochloric acid gentle Mamoru liquid of 0.05 M which include 2,000 unit (pH 8) including calcium chloride aqueous solution 5 ml of 0.01 M.

## 【0069】

Next, adding antitrypsin (antitrypsin, Sigma Chemical Co. make and product number A9024) aqueous solution of 1.5 mg unit, inactivation doing the trypsin (EC 3.4.21.4), stopping hydrolysis, it restricted extent of hydrolysis.

## 【0070】

When molecular weight of keratin fragment in hydrolysis liquid which it acquires was inspected with SDS Polyacrylamide electrophoresis method, as for keratin fragment with mixture which designates those of molecular weight 8,000~24,000 as main component, average molecular weight with number average was 17,000.

## 【0071】

With Lowry method concerning above-mentioned hydrolysis liquid when the protein quantification it does, concentration of keratin fragment was 3.5 weight%.



また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸 100 残基当りシステインを 8.4 個有していた。

[0072]

#### 実施例 2

実施例 1 における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液(3.5 重量%)50ml を 20 deg C に保ちながら、その中にトリプシン 8,000 ユニットを含む 0.05M のトリス/塩酸緩衝液(pH8)25ml と 0.01M の塩化カルシウム水溶液 25ml を加え、窒素ガス雰囲気下にて 15 分間攪拌した。

[0073]

ついで、上記反応液を加熱して 3 分間沸騰させ、トリプシンを失活させ、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

[0074]

以後、実施例 1 と同様の操作を経て得られた還元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法によって調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量 7,000~24,000 のものが主成分であり、平均分子量は 16,000 であった。

[0075]

上記還元ケラチン加水分解液について Lowry 法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は 3.5 重量%であった。

また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸 100 残基当りシステインを 8.5 個有していた。

[0076]

#### 実施例 3

実施例 1 における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液(3.5 重量%)50ml と 0.01M の塩化カルシウム水溶液 50ml の混合物を pH7.8~8.5 に調整したのち 20 deg C に保ちながら、その中に固定化トリプシン (Trypsin-30,Boehringer Mannheim,Cat.No.109851)8,000 ユニットを加え、窒素ガス雰囲気下にて 20 分間攪拌した後、遠心分離によりただちに固定化トリプシンを分離し、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

[0077]

以後、実施例 1 と同様の操作を経て得られた還

In addition, according to amino acid analysis, above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue 8.4 had had cysteine.

[0072]

#### Working Example 2

While reduction keratin aqueous solution which is acquired with reduction step in the Working Example 1 (3.5 weight% ) maintaining 50 ml at 20 deg C, 15 min it agitated under nitrogen gas atmosphere in that trypsin (EC 3.4.21.4 ) tris/hydrochloric acid gentle Mamoru liquid of 0.05 M which include 8,000 unit (pH 8 ) including calcium chloride aqueous solution 25 ml of 25 ml and 0.01 M.

[0073]

Next, heating above-mentioned reaction mixture, 3 min boiling doing, inactivation doing trypsin (EC 3.4.21.4 ), stopping hydrolysis, it restricted extent of the hydrolysis.

[0074]

From now on, passing by operation of being similar to Working Example 1, when you inspected molecular weight of keratin fragment in reduction keratin hydrolysis liquid which it acquires with SD Spolyacrylamide electrophoresis method, as for keratin fragment those of molecular weight 7,000~24,000 being main component , as for average molecular weight 16,000 was.

[0075]

With Lowry method concerning above-mentioned reduction keratin hydrolysis liquid when protein quantification it does, concentration of keratin fragment was 3.5 weight%.

In addition, according to amino acid analysis, above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue 8.5 had had cysteine.

[0076]

#### Working Example 3

While reduction keratin aqueous solution which is acquired with reduction step in the Working Example 1 (3.5 weight% ) 50 ml and after adjusting mixture of calcium chloride aqueous solution 50 ml of 0.01 M pH 7.8~8.5, maintaining at 20 deg C, in that to separate the immobilized trypsin at once after agitating, due to centrifugal separation under nitrogen gas atmosphere the immobilized trypsin (Trypsin-30,Boehringer Mannheim, Cat.No.109851 ) including 8,000 unit, 20 min, stopping hydrolysis, extent of hydrolysis was restricted.

[0077]

From now on, passing by operation of being similar to

元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法によって調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量 8,000~30,000 のものが主成分であり、平均分子量は 19,000 であった。

[0078]

上記還元ケラチン加水分解液について Lowry 法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は 3.5 重量%であった。

また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸 100 残基当りシステインを 8.5 個有していた。

[0079]

## 実施例 4

固定化トリプシン (Trypsin-30, Boehringer Mannheim, Cat.No.109851) とゲル [ Sephadex G-100(course) ] をリン酸緩衝液 (pH8) 中で体積比 1:30 で混合し、得られた混合物をガラスカラム (直径 2cm、高さ 10cm) に充填した。

[0080]

このカラムに実施例 1 における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液 (3.5 重量%) 20ml と 0.01M の塩化カルシウム水溶液 10ml との混合物を室温で 25 分間かけて流し、還元ケラチン水溶液が上記カラムを通過する間、加水分解した。

[0081]

得られた還元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により測定したところ、上記加水分解液中のケラチンフラグメントは分子量 7,000~30,000 のものが主成分であり、平均分子量は 20,000 であった。

[0082]

上記還元ケラチン加水分解液について Lowry 法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は 1.8 重量%であった。

また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸 100 残基当りシステインを 8.1 個有していた。

[0083]

## 比較例 1

実施例 1 における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液 (3.5 重量%) 50ml を 20 deg C に保ち

Working Example 1, when you inspected molecular weight of keratin fragment in reduction keratin hydrolysis liquid which it acquires with SD Spolyacrylamide electrophoresis method, as for keratin fragment those of molecular weight 8,000~30,000 being main component, as for average molecular weight 19,000 was.

[0078]

With Lowry method concerning above-mentioned reduction keratin hydrolysis liquid when protein quantification it does, concentration of keratin fragment was 3.5 weight%.

In addition, according to amino acid analysis, above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue 8.5 had had cysteine.

[0079]

## Working Example 4

immobilized trypsin (Trypsi n- 30, Boehringer Mannheim, Cat.No.109851) with in phosphoric acid gentle Mamoru liquid (pH 8) it mixed the gel {Sephadex G-100 (course)} with volume ratio 1:30, mixture which is acquired it was filled in glass column (diameter 2 cm, height 10 cm).

[0080]

Reduction keratin aqueous solution which is acquired with reduction step in Working Example 1 in this column (3.5 weight%) 25 min applying mixture of 20 ml and calcium chloride aqueous solution 10 ml of 0.01 M with room temperature, it let flow, while reduction keratin aqueous solution passes above-mentioned column, hydrolysis it did.

[0081]

When molecular weight of keratin fragment in reduction keratin hydrolysis liquid which it acquires was measured due to SD Spolyacrylamide electrophoresis method, as for keratin fragment in the above-mentioned hydrolysis liquid those of molecular weight 7,000~30,000 being main component, as for average molecular weight 20,000 was.

[0082]

With Lowry method concerning above-mentioned reduction keratin hydrolysis liquid when protein quantification it does, concentration of keratin fragment was 1.8 weight%.

In addition, according to amino acid analysis, above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue 8.1 had had cysteine.

[0083]

## Comparative Example 1

While reduction keratin aqueous solution which is acquired with reduction step in the Working Example 1 (3.5 weight%)

ながら、その中にトリプシン 8,000 ユニットを含む 0.05M のトリス/塩酸緩衝液 25ml と 0.01M の塩化カルシウム水溶液 25ml との混合物を加え、窒素ガス雰囲気下で 3 時間攪拌して還元ケラチンを加水分解した。

## 【0084】

得られた還元ケラチン加水分解物中のケラチンフラグメントの分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、上記ケラチンフラグメントは分子量は 1,000~3,000 のものが主成分であり、平均分子量は 2,000 であった。

## 【0085】

また、上記ケラチンフラグメントのアミノ酸分析をしたところ、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸 100 残基当り 7.1 個のシステインを有していた。

## 【0086】

## 試験例 1

実施例 1~4 および比較例 1 で得られたケラチンフラグメントの水溶液それぞれ 6ml に 75 重量%グリセリン水溶液 0.2ml を加え、それらをそれぞれ別々に水平な底面を持つ円形ガラス容器(直径 6cm)に流し、室温、大気中で乾燥した。

その後、80~90 deg C で 15 分間加熱処理した後、水中に入れ、ガラス容器から剥離してきたケラチンフラグメントのフィルムを取り出した。

## 【0087】

得られたフィルムの強伸度をオートグラフにより測定した。

その結果を表 1 に示す。

なお、測定にあたっての試料の調整および測定条件は次の通りである。

## 【0088】

## 試料:

得られたフィルムを風乾した後、80 deg C で 20 分間熱処理し、その後、室温まで戻す。

## 【0089】

## 測定条件:

相対湿度 65% の雰囲気中、引張速度

maintaining 50 ml at 20 deg C, 3 hours agitating under the nitrogen gas atmosphere in that trypsin (EC 3.4.21.4) including mixture of tris/hydrochloric acid gentleMamoru liquid 25 ml of 0.05 M which include 8,000 unit and calcium chloride aqueous solution 25 ml of 0.01 M, hydrolysis it did reduction keratin.

## 【0084】

When molecular weight of keratin fragment in reduction keratin hydrolysate which it acquires was inspected with SD Spolyacrylamide electrophoresis method, as for above-mentioned keratin fragment as for molecular weight thing 1,000 - 3,000 being main component, as for average molecular weight 2,000 was.

## 【0085】

In addition, when amino acid analysis of above-mentioned keratin fragment is done, the above-mentioned keratin fragment per amino acid 100 residue had had 7.1 cysteine.

## 【0086】

## Test Example 1

aqueous solution of keratin fragment which is acquired with Working Example 1~4 and Comparative Example 1 respectively those it let flow to round glass container (diameter 6 cm) which each one separately has horizontal bottom surface in 6 ml including 75 weight% glycerin aqueous solution 0.2 ml, dried in the room temperature, atmosphere.

After that, 15 min heat treatment after doing, you inserted in underwater with 80 -90 deg C, you removed film of keratin fragment which peels off from the glass container.

## 【0087】

tenacity of film which it acquires was measured due to the autograph.

Result is shown in Table 1.

Furthermore, adjustment and measurement condition of sample at time of measurement are as follows.

## 【0088】

## sample:

air dry after doing film which it acquires, 20 min thermal processing it does with 80 deg C, after that, resets to room temperature.

## 【0089】

## measurement condition:

In atmosphere of relative humidity 65%, it measures with

200mm/min で測定する。

strain rate 200 mm/min.

【0090】

【0090】

【表 1】

[Table 1]

フィルム	強 伸 度 (相対湿度 65%)
実施例 1	0.81 kg/mm <sup>2</sup>
実施例 2	0.85 kg/mm <sup>2</sup>
実施例 3	0.82 kg/mm <sup>2</sup>
実施例 4	0.82 kg/mm <sup>2</sup>
比較例 1	0.30 kg/mm <sup>2</sup>

【0091】

表 1 に示すように、実施例 1~4 で製造したケラチンフラグメントから作製したフィルムは、比較例 1 で製造したケラチンフラグメントから作製したフィルムに比べて、強伸度が大きかった。

【0091】

As shown in Table 1, as for film which is produced from the keratin fragment which is produced with Working Example 1~4, tenacity was large in comparison with film which is produced from keratin fragment which is produced with Comparative Example 1.

【0092】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、ケラチン含有物質から得られた還元ケラチンを蛋白質加水分解酵素により制限的に加水分解することによって、平均分子量 3,000~30,000 でアミノ酸 100 残基当たり 4~16 個のシステインを有するケラチンフラグメントを得ることができる。

【0092】

[Effects of the Invention]

As above explained, according to this invention, reduction keratin which is acquired from keratin containing substance hydrolysis is done in restricted with the protein hydrolase, per amino acid 100 residue keratin fragment which possesses cysteine 4 - 16 can be acquired with average molecular weight 3,000~30,000 with.

【0093】

上記ケラチンフラグメントは、フィルム、繊維などに加工した場合に好適な強度を持ち得ようになる適度な長さのペプチド鎖と架橋可能なチオール基を有している。

【0093】

Above-mentioned keratin fragment, when it processes in film, fiber etc, has had peptide chain and crosslinkable thiol group of suitable length which reaches point where it can have preferred intensity.

【0094】

また、上記ケラチンフラグメントは天然の蛋白質に由来するものであって、人体に対する毒性、刺激性なども少ない。

【0094】

In addition, above-mentioned keratin fragment being something which derives in natural protein, toxicity, stimulation etc for human body is little.

【0095】

したがって、このケラチンフラグメントは、上記の特性を利用して、フィルム、スポンジ、繊維などの材料として、あるいはマイクロカプセルの壁材、医薬薬基材、化粧品基材として、好適に使用することができる。

【0095】

Therefore, as for this keratin fragment, making use of above-mentioned characteristic, you can use for ideal as film, sponge, fiber or other material, or as wall material, pharmaceuticals and pesticides substrate, cosmetics substrate of microcapsule.